

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. April 2005 (07.04.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/031344 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/483,
C30B 31/04, 29/58

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/010539

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. September 2004 (20.09.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 43 522.0 19. September 2003 (19.09.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PROTEROS BIOSTRUCTURES GMBH
[DE/DE]; Am Klopferspitz 19, 82152 Martinsried (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NEUEFEIND, Torsten
[DE/DE]; Am Weiher 3a, 82131 Gauting (DE). BRAND-
STETTER, Hans [DE/DE]; Am Weiher 25, 82131 Gaut-
ing (DE).

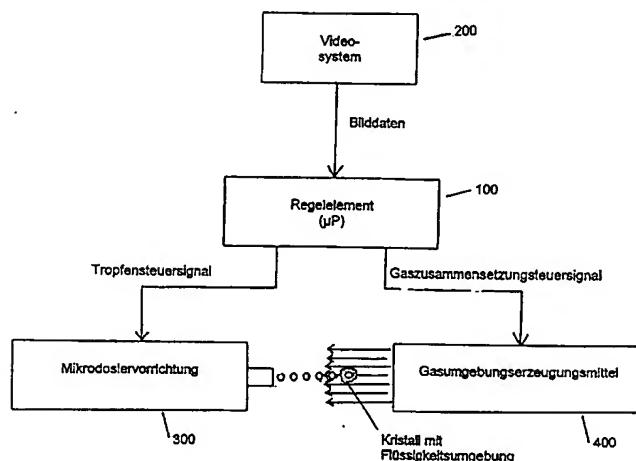
(74) Anwälte: GRAF VON STOSCH, Andreas usw.; Bosch,
Graf von Stosch, Jehle, Flüggenstr. 13, 80639 München
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR CONTROLLING THE TREATMENT OF A CRYSTAL BY MEANS OF A LIQUID

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR STEUERUNG DER BEHANDLUNG EINES KRISTALLS MIT EINER FLÜSSIGKEIT



(57) Abstract: The invention relates to a method for controlling the treatment of a crystal (2) by means of a liquid, wherein an image signal is captured by an image capturing system (200), said image signal representing a momentary image of a crystal having drops poured thereon by an electrically controllable microdosing system (11, 300), said image signal having a liquid environment whereby the image signal is treated and the momentary surface of the crystal and the liquid environment thereof is determined in the entire image by the image signal; the momentary surface is compared to a predefined desired value and a corrector drop control signal is determined and sent to the microdosing system if the surface is different from the desired value and the corrector drop signal is formed in such a manner that it represents a corrected frequency and/or variable and/or form of the drops which are to be applied to the crystal and the liquid environment thereof, which are selected such that the difference with respect to the desired value is minimised.

(57) Zusammenfassung: Die Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Steuerung der Behandlung eines Kristalls (2) mit einer Flüssigkeit, bei dem von einem Bildaufnahmesystem (200) ein Bildsignal empfangen wird, das ein momentanes Bild eines von einem elektrisch steuerbaren Mikrodosiersystems (11, 300) betropften Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung repräsentiert; das Bildsignal verarbeitet und aus dem Bildsignal die momentane Fläche des Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

in dem Gesamtbild ermittelt wird; die momentane Fläche mit einem vorgegebenen Sollwert verglichen wird und bei Abweichung der Fläche vom Sollwert ein Korrekturtropfensteuersignal ermittelt und zu dem Mikrodosiersystem gesendet, wobei das Korrekturtropfensignal so ausgebildet ist, dass es eine korrigierte Frequenz und/oder Grösse und/oder Form der von dem Mikrodosiersystem auf den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung aufzubringenden Tropfen repräsentiert, die so gewählt ist bzw. sind, dass die Abweichung vom Sollwert minimiert wird.

5

Verfahren zur Steuerung der Behandlung eines Kristalls mit einer Flüssigkeit

10

In der Proteinkristallographie kommt es häufig vor, daß vor der kristallographischen Messung
15 Liganden oder Inhibitoren in eine Proteinstruktur bzw. einen Proteinkristall eingebracht werden sollen. Ziel ist es dabei, die kristallographische Struktur eines Proteins ohne und mit Ligand oder Inhibitor zu vergleichen und die räumliche Anordnung des Liganden oder Proteins zu ermitteln. Liganden können hierbei alle an ein Protein oder Polypeptid bindenden Moleküle oder Substanzen sein, die bspw. inhibitorische Wirkung oder auch agonistische Wirkung
20 auf die Funktion des Proteins haben können. Ggf. können Liganden organisch-chemische Moleküle sein oder auch (modifizierte) Antikörper oder Antikörperfragmente, native Bindungspartner oder Fragmente, ggf. modifiziert, vom kristallisierten Protein. Weiterhin werden regelmäßig auch Schwermetallatom-Derivate in der Kristallographie benötigt, um die entsprechende Phaseninformationen zu erhalten. Ein Ligand i.S. der vorliegenden Erfindung kann
25 daher auch ein an das kristallisierte Protein bindendes Schwermetallatom(salz) sein.

Ein im Stand der Technik bekanntes Verfahren zum Einbringen von Liganden, bspw. Inhibitoren, ist das sogenannte „Soaking“ mit einem Puffer, der aus der Kristallisationslösung sowie dem Liganden besteht. Falls ein in den Kristall zu „soakender“ Ligand schlecht oder nur
30 schwerlöslich ist, können dem Puffer zur Erhöhung der Löslichkeit desselben weitere Substanzen als Löslichkeitsverbesserer zugesetzt werden. Beispielsweise kann es sich um Lösungsmittel wie DMSO (Dimethylsulfoxid), TFE, Ethanol, 2-Nitropropan oder andere organische Lösungsmittel handeln.

Das „Soaking“-Verfahren besitzt verschiedene Nachteile. So besteht ein Nachteil darin, daß die Kristalle beim „Soaking“ einer anderen Umgebung ausgesetzt werden müssen, wodurch der Kristall Schaden erleiden kann, d.h. insbesondere, dass die Mikrostruktur des Kristalls nach dem „Soaking“ Unregelmäßigkeiten aufweist, die das Diffraktionsvermögen des Kristalls beeinträchtigen. Sollen z.B. schwerlösliche Inhibitoren oder Liganden in die Proteinkristallstruktur eingebracht werden, so benötigt man sehr hohe Konzentrationen an Lösungsmittel. Gerade hohe Lösungsmittelkonzentrationen führen aber häufig zur Zerstörung der fragilen Proteinkristalle, wie zuvor erwähnt.

- 10 Darüber hinaus besteht ein weiterer Nachteil des herkömmlichen „Soaking“-Verfahrens in dem hohen Zeitaufwand des Verfahrens. Dieser ist zum einen durch die unter Umständen zahlreichen (repetitiven) „Soaking“-Prozesse bedingt, die ggf. unter Veränderung der Konzentrationsverhältnisse des zu „soakenden“ Liganden durchlaufen werden müssen, um überhaupt eine geeignete, die Liganden oder Inhibitoren enthaltende, also komplexierte Proteinkristallstruktur (Cokristall) zu erhalten, und zum anderen dadurch, daß bereits ein einzelner Soaking-Prozeß bereits sehr zeitaufwendig sein kann, da bspw. die Diffusionskinetik beachtet werden muß.

- 20 Ein weiterer Nachteil des „Soaking“-Verfahrens besteht darin, daß röntgenkristallographische Untersuchungen oder Untersuchungen des Proteinkristalls mit Röntgenstrahlung während des „Soaking“-Verfahrens technisch nicht möglich sind.

- 25 Daher sind eine verbesserte Vorrichtung und ein verbessertes Verfahren zur Behandlung von Kristallen entwickelt worden, die in der vom gleichen Anmelder wie die vorliegende Anmeldung stammenden Deutschen Patentanmeldung Nr. 103 36 110.3 beschrieben worden sind. Diese Anmeldung wird daher insoweit vollumfänglich in die Offenbarung der vorliegenden Anmeldung einbezogen.

- 30 Die verbesserte Vorrichtung und das verbesserte Verfahren weisen eine Halterung zur Befestigung des Kristalls und ein Mikrodosiersystem auf, das im Verhältnis zur Halterung so angeordnet ist, daß damit Mikro-Tropfen einer Flüssigkeit, die bspw. Lösungsmittel und mindestens einen Ligandentyp aufweist, auf den in der Halterung befestigten Kristall aufgebracht

werden können. Durch das Auftropfen von Mikro-Tropfen mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung läßt sich eine wesentlich schonendere Behandlung von Kristallen und insbesondere Proteinkristallen mit bestimmten aufzubringenden Substanzen, die in einer Lösung enthalten sind, erreichen. Diese Substanzen können bei Proteinkristallen Liganden, bspw. Inhibitoren, Substrate oder Reaktanden, sein. Bei den Liganden wird es sich bei Proteinkristallen typischerweise um Agonisten, Substrate, Antagonisten oder Cofaktoren der kristallisierten Proteine handeln. Gemäß einer Abwandlung der verbesserten Vorrichtung ist die Kristallhalterung so ausgebildet, daß durch die Halterung ein Gasstrom geführt werden kann, der auf den in der Halterung befestigten Kristall gerichtet ist. Dadurch kann der Kristall während der Behandlung durch die Mikro-Tropfen in einer definierten Umgebung gehalten werden.

Es hat sich gezeigt, daß die Steuerung des Tropfenbehandlungsprozesses schwierig ist, denn die Tropfenbehandlung muß in sehr präziser Weise durchgeführt werden, damit insbesondere empfindliche Proteinkristalle während des Kristallbehandlungsprozesses nicht beschädigt werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt daher darin, ein verbessertes Verfahren zur Steuerung der Behandlung eines Kristalls mit einer Flüssigkeit zu schaffen.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Steuerung der Behandlung eines Kristalls mit einer Flüssigkeit mit den folgenden Schritten gelöst:

1. es wird von mindestens einem Bildaufnahmesystem ein Bildsignal empfangen, das ein momentanes Bild eines Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung repräsentiert, wobei auf den Kristall während des Kristallbehandlungsprozesses Tropfen von einem elektrisch steuerbaren Mikrodosiersystem aufgebracht werden, die eine Flüssigkeit enthalten, mit der der Kristall behandelt werden soll;
2. es wird das Bildsignal verarbeitet und aus dem Bildsignal werden die momentane Fläche des zweidimensionalen Bildbereichs, der die Einheit Kristall mit Flüssigkeitsumgebung repräsentiert, oder das momentane Volumen der Einheit Kristall mit Flüssigkeitsumgebung ermittelt;
3. es wird die momentane Fläche oder das momentane Volumen mit einem Sollwert verglichen;

4. bei Abweichung der Fläche oder des Volumens vom Sollwert wird ein Korrekturtropfensteuersignal ermittelt und zu dem Mikrodosiersystem gesendet, wobei das Korrekturtropfensignal so ausgebildet ist, daß es eine korrigierte Frequenz und/oder Größe und/oder Form der von dem Mikrodosiersystem auf den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung aufzubringenden Tropfen repräsentiert, die so gewählt ist bzw. sind, daß die Abweichung vom Sollwert minimiert wird.

Gemäß dieser Lösung wird eine einfache Steuerung des Kristallbehandlungsprozesses dadurch erreicht, daß permanent die Fläche des Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung in einem zweidimensionalen Bild oder das Volumen des Kristalls überwacht wird und in Abhängigkeit von Änderungen der Fläche oder des Volumens z.B. die Frequenz mit der die Tropfen auf den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung aufgebracht werden, so korrigiert wird, daß eine schonende Behandlung des Kristalls möglich ist.

Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

Bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden nachfolgend unter Bezug auf die beiliegende Zeichnung näher erläutert. Es zeigen

Fig. 1 eine teilweise im Schnitt dargestellte Ansicht einer bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendeten Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit einer Lösung,

Fig. 2 ein Gehäuse eines bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Steuergeräts zur Steuerung eines bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendeten Mikrodosiersystems,

Fig. 3 ein Blockschaltbild zur Veranschaulichung der Steuerung der Behandlung eines Kristalls mit einer Flüssigkeit gemäß einer Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Verfahrens;

Fig. 4a) die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren ermittelte Änderung der Fläche des Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung in einem aufgenommenen zweidimensionalen Bild und aufgetragen über die Zeit;

- 5 Fig. 4b) die Änderung der Ausdehnung des Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung in x- und y-Richtung in einem aufgenommenen zweidimensionalen Bild und aufgetragen über die Zeit;

Fig. 5 ein Flüssigkeitszufuhrsystem für ein Mikrodosiersystem, das bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet werden kann.

10

Fig. 6 zwei Graphen mit abnehmender Luftfeuchtigkeit und zunehmender Tropfenfrequenz.

15

Die Erfindung wird im folgenden am Beispiel der Steuerung der Behandlung von Proteinkristallen beschrieben, sie kann aber auch in analoger Weise bei der Steuerung der Flüssigkeitsbehandlung von anderen Kristallen eingesetzt werden.

20

Zur Veranschaulichung einer Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zunächst eine bei einer Ausführungsform des Verfahrens verwendete Vorrichtung zur Behandlung eines Kristalls mit einer Flüssigkeit beschrieben, die in der Fig. 1 dargestellt ist. Dabei ist links in der Fig. 1 eine Halterung 1 dargestellt, die dazu dient, einen Proteinkristall 2 zu befestigen. Die in der Fig. 1 dargestellte Halterung, die in ihrer generischen Art auch als „free mounting system“ bezeichnet wird, ist bereits aus dem Stand der Technik bekannt und z.B. in der Deutschen Patentschrift DE 198 42 797 C1 beschrieben worden. Diese Druckschrift wird insoweit vollumfänglich in die Offenbarung der vorliegenden Anmeldung einbezogen.

25

30

Die Halterung 1, die in der Fig. 1 in einer Schnittansicht von der Seite dargestellt ist, besteht im wesentlichen aus einem Trägerblock 3, der ein einschiebbares Einsatzteil 4 aufweist, das in eine Öffnung des Trägerblocks 3 eingeschoben werden kann. Am Einsatzteil ist eine Haltekapillare 5 angebracht, an deren freiem Auflageende der Proteinkristall 2 gehalten wird. Die Haltekapillare besteht z.B. aus einer Mikropipette, in der über eine in der Fig. 1 nicht dargestellte und mit dem anderen Ende der Mikropipette verbundene Pumpvorrichtung ein Unter-

druck erzeugt wird, der dazu dient, den Proteinkristall 2 an dem freien Auflageende zu halten. Das linke Ende 8 des Einsatzteils ist so ausgebildet, daß daran die Halterung 1 an einem Goniometerkopf einer Röntgen- oder Synchrotronbestrahlungsanlage befestigt werden kann.

- 5 Anstelle der Mikropipette kann zum Halten des Kristalls auch ein sogenannter „Loop“, d.h. eine feine Schlaufe, die z.B. aus Nylon bestehen kann, verwendet werden. Ein solcher „Loop“ wird z.B. von der Firma Hampton Research angeboten.

- 10 In einer Röntgen- oder Synchrotronbestrahlungsanlage kann die Beugung von Röntgenstrahlen beim Durchgang durch das Kristallgitter des Proteinkristalls ausgenutzt werden, um aus dem Beugungsbild auf die räumliche Anordnung der Atome und Moleküle in dem kristallisierten Protein zu schließen bzw. die Struktur durch mathematische Operationen zu errechnen. Die erforderlichen Röntgenstrahlen können z.B. durch Beschuß von Kupfer oder anderen Materialien mit Elektronen erzeugt werden (bspw. $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung). Alternativ kann die
- 15 Röntgenstrahlung auch in einem Synchrotron, d.h. einem Teilchenbeschleuniger, erzeugt werden, bei dem die Röntgenstrahlung von auf Kreisbahnen beschleunigten Elektronen emittiert wird. Das Synchrotron besitzt trotz des größeren apparativen Aufwands eine Reihe von Vorteilen gegenüber der herkömmlichen Erzeugung von Röntgenstrahlung durch Elektronenbeschuß von Metallen. So besitzen die durch Synchrotrone erzeugten Röntgenstrahlen
- 20 eine höhere Intensität und können in verschiedenen Wellenlängen gewählt werden. Auch besteht auf diese Weise die Möglichkeit, „weißes“ Röntgenlicht einzusetzen und damit den Kristall mit Röntgenblitzen, die Röntgenstrahlen aller Wellenlängen aufweisen, zu beschießen. Darüber hinaus lassen sich die Messungen mit dem Synchrotron wesentlich schneller als mit herkömmlichen Röntgenbestrahlungsanlagen durchführen.

25

- In die Halterung 1 ist ferner ein Gaskanal 6 integriert, dessen Mündungsende 7 auf das freie Auflageende der Haltekapillare 5 gerichtet ist, an dem der Proteinkristall 2 befestigt ist. Dabei wird der am Auflageende angebrachte Proteinkristall 2 vollständig vom Gasstrom aus dem Gaskanal 6 umschlossen, so daß eine definierte Gasatmosphäre um den Proteinkristall herum
- 30 erzeugt werden kann. Der Gaskanal 6 ist an seinem in der Fig. 1 als offen dargestellten Ende mit einem Gaserzeugungsmittel und einem Gasmischmittel verbunden, mit dem die Zusammensetzung des Gasstroms variabel eingestellt werden kann. Falls das um den Proteinkristall

herum befindliche Gas Luft ist, kann das Gasmischmittel z.B. dazu dienen, die Luftfeuchtigkeit auf einen vorherbestimmten optimalen Wert einzuregeln. Es kann darüber hinaus auch ein Temperatureinstellmittel vorgesehen sein, mit dem die Temperatur des Gasstroms gemessen und auf einen bestimmten vorgebbaren Wert eingeregelt werden kann. Auch können andere gasförmige Substanzen dem Gasstrom beigemischt werden, so dass bspw. der Stickstoff- oder Sauerstoffgehalt der Luft modifiziert, bspw. erhöht, werden kann.

In der Deutschen Patentanmeldung Nr. 10232172.8-52 mit dem Titel „Vorrichtung und Verfahren zur Erzeugung einer definierten Umgebung für partikelförmige Proben“ ist bereits eine Vorrichtung und ein Verfahren beschrieben, mit dem sich eine hochgenaue und langzeitstabile Feuchteinstellung eines durch die oben beschriebene Halterung geführten feuchten Gasstroms am Ort des partikelförmigen Kristalls erreichen läßt. Diese Druckschrift wird daher insoweit ebenfalls vollumfänglich in die Offenbarung der vorliegenden Anmeldung einbezogen.

Über dem Kristall ist ein Mikroskop mit Videosystem 10 angebracht, mit dem der Proteinkristall während der Behandlung mit der Substanz beobachtet werden kann. Ggf. kann infolge der Beobachtung über das Videosystem der Behandlungsmodus modifiziert oder auch die Behandlung eingestellt werden.

Die in der Fig. 1 dargestellte erfindungsgemäße Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit einer Substanz umfaßt darüber hinaus ein Mikrodosiersystem 11, das rechts in der Fig. 1 in einer Seitenansicht im Schnitt dargestellt ist.

Das Mikrodosiersystem 11 umfaßt eine sogenannte Piezopipette 12, die in einem Stativ 15 gehalten wird und so auf den Proteinkristall 2 ausgerichtet ist, daß dieser mittels der Piezopipette mit Tropfen beschossen werden kann. Die Piezopipette ist in der Fig. 1 aus Gründen der Anschaulichkeit in einem vergrößerten Maßstab im Verhältnis zur Halterung 1 dargestellt. Die Piezopipette ist so angeordnet, daß die Spitze der Piezopipette einen Abstand von typischerweise 3 mm zu dem Proteinkristall aufweist. Vorzugsweise liegt dieser Abstand in einem Bereich von 1 – 5 mm, kann jedoch unter besonderen Umständen auch größer oder kleiner gewählt werden.

Die Piezopipette 12 besteht aus einer Glaskapillare 13, die z.B. aus Borosilicatglas bestehen kann. Der Durchmesser der Öffnung der Glaskapillare ist einer der Faktoren, die die Größe der von der Piezopipette abgegebenen Mikro-Tropfen beeinflussen und kann z.B. in einem Bereich zwischen 5 und 50 Mikrometer liegen. Die Glaskapillare 13 ist von einem piezoelektrischen Element 14 umschlossen, das aus einem Material besteht, das einen piezoelektrischen Effekt zeigt. Es kann sich bei diesem Material z.B. um einen Piezokristall handeln. Das piezoelektrische Element 14 ist darüber hinaus über zwei Kabel 16 mit einem Steuergerät 17 elektrisch verbunden, mit dem eine Spannung an das piezoelektrische Element 14 angelegt werden kann. Wird ein Spannungspuls durch das Steuergerät 17 an das piezoelektrische Element 14 angelegt, so wird das piezoelektrische Element 14 und mit diesem auch die Glaskapillare 13 kontrahiert und ein Tropfen aus der Öffnung der Piezopipette herausgeschossen. Über das Steuergerät 17 können unterschiedlich geformte Spannungspulse an die Piezopipette angelegt werden, deren Formen die Form und Größe der Mikro-Tropfen und deren Frequenz die Frequenz der Mikro-Tropfen beeinflussen.

In der Fig. 2 ist ein Gehäuse eines möglichen Steuergeräts zur Steuerung der Piezopipette dargestellt, wobei die einzelnen Steuerungsmöglichkeiten anhand der in der Fig. 2 dargestellten Schalter und Steuerelemente des Steuergeräts erläutert werden sollen. Das Steuergerät weist zunächst drei verschiedene LCD-Anzeigen 20, 21 und 22 auf. Auf der ersten LCD-Anzeige 20 wird der aktuelle Wert für den Spannungspegel der Impulsausgangsspannung für das Piezopipettensteuersignal angezeigt. Dieser Wert läßt sich über einen Drehregler 23 variabel einstellen. Auch die Impulsweite des Pipettenansteuersignals, die auf der zweiten LCD-Anzeige 21 in Mikrosekunden angezeigt wird, läßt sich mittels eines zweiten Drehreglers 24 einstellen. Schließlich ist ein Druckschalter 25 vorgesehen, um die Frequenz der an die Piezopipette angelegten Spannungsimpulse einzustellen, die auf der dritten LCD-Anzeige 22 angezeigt wird. Diese Frequenz, die bis zu einige kHz betragen kann (z.B. 2 kHz) entspricht der Frequenz, mit der die Mikro-Tropfen aus der Piezopipette auf den Kristall geschleudert werden. Der Einstellbereich der Frequenz kann z.B. in einem Bereich zwischen 1 Hz und 6 kHz liegen. Die Höhe der Impulsausgangsspannung und die Weite der Spannungsimpulse müssen so eingestellt werden, daß es überhaupt zu einer Tropfenerzeugung mit der Piezopipette kommt.

Das Steuergerät weist ferner zwei Eingänge 26 auf, an denen die beiden Verbindungskabel der Piezopipette angeschlossen werden. Ferner sind ein Netzkabel 27 sowie ein Netzanschluß 28 zur Stromversorgung des Steuergeräts vorgesehen. Über den weiteren Signaleingang 29
 5 können von anderen elektrischen Geräten vorgegebene Spannungsimpulsfolgen angelegt werden, um die Mikro-Tropfenerzeugung auszulösen und die Mikro-Tropfenfolge und -form von außen zu steuern, was unten näher beschrieben wird.

Der Schalter 30 ist dazu vorgesehen, den Piezopipettenbetrieb ein- und auszuschalten. Über
 10 den weiteren Schalter 31 kann zwischen Einzelspannungsimpulsbetrieb und kontinuierlichem Spannungsimpulsbetrieb umgeschaltet werden, d.h. zwischen Einzeltropfenerzeugung und kontinuierlicher Tropfenerzeugung. Für die Einzeltropfenerzeugung kann ferner ein Taster 32 vorgesehen sein, über den einzelne Spannungsimpulse an die Piezopipette angelegt werden können, wenn es gewünscht ist, einzelne Tropfen per Handbetrieb auf den Kristall zu schie-
 15 ßen.

Der Schalter 33 dient schließlich dazu zwischen verschiedenen Impulsformen der an die Piezopipette 12 angelegten Spannungsimpulse variieren zu können. In der Schalterstellung A kann z.B. ein vorgegebener Standard-Rechteckspannungsimpuls mit vorherbestimmter Dauer
 20 und Höhe erzeugt werden, während in der Schalterstellung B ein Rechteckspannungsimpuls erzeugt werden kann, dessen Dauer und Höhe variabel eingestellt werden kann. Es ist natürlich bei anderen Ausführungen auch denkbar, daß Spannungsimpulse angelegt werden, die von der Rechteckform abweichen.

25 Verschiedene Größen der Mikro-Tropfen, die z.B. für verschiedene Kristallgrößen geeignet sein können, können über die Variation der Spannungspulsweiten und Spannungspulshöhen eingestellt werden, die an die Piezopipette angelegten Spannungen aufweisen.

Die Glaskapillare 13 der Piezopipette 12 ist typischerweise über eine Zuleitung 18 mit einem
 30 in der Figur 1 nicht dargestellten Vorratsgefäß verbunden, das die Lösung enthält, die auf den Proteinkristall getropft werden soll. Diese Lösung enthält die Substanz oder die Substanzen, mit der bzw. denen der Proteinkristall behandelt werden soll. Die Oberkante des Flüssigkeits-

spiegels der sich im Vorratsgefäß befindenden Flüssigkeit sollte dabei etwas höher als die Unterkante der Pipettendüse eingestellt werden. Alternativ dazu kann die Flüssigkeit bei einer Lösung ohne Vorratsgefäß aber auch direkt über die Auslaßöffnung der Piezopipette in die Piezopipette gesaugt werden, um sie dann später wieder abgeben zu können. Es kann auch
 5 eine Temperiertvorrichtung um das Vorratsgefäß herum angeordnet sein, um die in dem Vorratsgefäß sich befindende Flüssigkeit auf eine gewünschte Temperatur zu bringen. Gemäß einer Ausführungsform kann vor dem Aufbringen der Lösung auf den Kristall der pH-Wert und/oder die Ionenstärke (bzw. spezifische Salzkonzentrationen) der Lösung gemäß den im Stand der Technik bekannten Verfahren auf einen gewünschten Wert eingestellt werden.

10

Unter Mikro-Tropfen im Sinne der vorliegenden Erfindung sollen Tropfen zu verstehen sein, deren Volumen kleiner als 1 nl ist, wobei das Volumen der Mikro-Tropfen vorzugsweise zwischen 1 nl (nanoliter) und 1 pl (picoliter), noch weiter bevorzugt zwischen 100 pl und 20 pl und noch stärker bevorzugt zwischen 20 pl und 1 pl liegt. Aus diesen Größen lassen sich über
 15 die Volumensformel die entsprechenden geeigneten Durchmesser der Tropfen errechnen, wenn man näherungsweise davon ausgeht, daß die Tropfen kugelförmig sind. Das gewünschte Tropfenvolumen kann erfindungsgemäß eingestellt werden.

20

Die Mikro-Tropfen der auf den Kristall aufzubringenden Flüssigkeit sind dabei vorzugsweise kleiner als das Volumen des Kristalls. Ein typisches Kristallvolumen kann dabei z.B. in einer Größenordnung von 1 nl liegen.

25

Das Volumen der im speziellen Fall verwendeten Mikro-Tropfen wird in Abhängigkeit vom Volumen des Kristalls gewählt. Dabei betragen die Volumen der Mikrotropfen weniger als 50 %, z.B. 1 bis 20 %, des Kristallvolumens und vorzugsweise von 1 bis 10 % des Kristallvolumens.

30

Die Tropfenerzeugung mittels einer Piezopipette ist nur ein Beispiel für eine Mikrodosiertvorrichtung. Es können auch andere Vorrichtungen verwendet werden, die in der Lage sind, Mikro-Tropfen zu erzeugen.

So kann z.B. auch ein Mikrodosiersystem verwendet werden, das eine Kapillare und ein in der Kapillare angeordnetes Mikroventil umfaßt. Dabei wird die Flüssigkeit unter Druck aus einem Vorratsgefäß auf das Mikroventil gepreßt, das von einem Steuergerät elektrisch innerhalb eines kurzen Zeitintervalls geöffnet und danach wieder geschlossen wird, um die Tropfen zu erzeugen. Die Begrenzung der Tropfengröße ergibt sich hier durch die noch steuerbare Öffnungs-
 5 dauer des Ventils.

Als Mikrodosiersystem kann bei einer anderen Ausführungsform auch ein Zerstäuber dienen. Ein Zerstäuber hat allerdings gegenüber den oben beschriebenen Lösungen den Nachteil, daß
 10 das Ausrichten der Tropfen auf den Kristall schwieriger ist. Daher wird vorteilhafter Weise dem Zerstäuber ein Mittel nachgeordnet, das die Orientierung der aus dem Zerstäuber erhaltenen Mikro-Tropfen auf den Kristall sicherstellt.

Bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Proteinkristall zunächst an dem freien Auflagenende der Haltekapillare 2 befestigt. Anstelle der Haltekapillare 2 kann auch ein sogenannter „Loop“, also eine Art Schlaufe, verwendet werden, in dem der Proteinkristall befestigt ist. Der Proteinkristall ist dabei frei von jeglicher Oberflächenlösung und damit zugänglich für Lösungen, die von außen direkt mittels des Mikrodosiersystems aufgebracht werden können. Durch die Halterung 1 wird nun typischerweise eine Gasatmosphäre um den Proteinkristall 2 herum erzeugt, indem ein Gasstrom definierter Zusammensetzung und Temperatur durch den Gaskanal 6 der Halterung 1 geführt wird. Bei dem beschriebenen Verfahren wird es sich typischerweise um einen Luftstrom, ggf. unter Beimischung anderer gasförmiger Substanzen, mit einem geregelten Feuchtigkeitsgehalt (d.h. Wassergehalt) und einer geregelten Temperatur handeln.
 25

In die Kristallstruktur des Proteinkristalls soll nun ein Inhibitor eingebracht werden, der Bestandteil einer Substanz ist, die der Lösung zugesetzt wurde, die sich in dem Vorratsgefäß befindet, das mit der Piezopipette verbunden ist. Es hat sich durch Experimente gezeigt, daß lokal auf die Oberfläche des Kristalls aufgebrachte Lösungen (wie bspw. DMSO) mit hoher
 30 Inhibitor-Konzentration den Kristall in der Regel nicht schädigen. Nun werden durch das Steuergerät 17 elektrische Spannungspulse an die Piezopipette 12 angelegt und Mikro-Tropfen mit der Inhibitor-Lösung auf den Proteinkristall 2 geschleudert. Durch das Aufsprit-

zen einzelner Mikro-Tropfen bleibt der den Proteinkristall umströmende Gasstrom praktisch unbeeinflusst, so daß der Proteinkristall in seiner stabilen definierten Umgebung verbleibt. Die Erhaltung einer stabilen Umgebung ist insbesondere für die relativ instabilen Proteinkristalle, die durch geringe Gitterkräfte zusammengehalten werden, wichtig, damit die Kristalle nicht zerstört werden, bevor sie z.B. einer röntgenkristallographischen Untersuchung unterzogen werden. Die Feuchtigkeit des den Kristall umgebenden Luftstroms kann nun im Zusammenspiel mit der Größe und Frequenz der über die Mikrodosiervorrichtung auf den Proteinkristall aufgetragenen Tropfen so eingestellt werden, daß der Kristall möglichst sein Volumen nur wenig ändert, indem ein Gleichgewicht zwischen Abdampfen von Flüssigkeit vom Kristall und Zuwachs an Flüssigkeit durch Auftropfen von Flüssigkeit mittels der Mikrodosiervorrichtung erreicht wird. Dadurch wird der Kristall nur minimal belastet und es kann ein schonendes Einbringen des/der Liganden über die lokal aufgetragenen Mikrotropfen erreicht werden. Dieser Vorgang der Einstellung der optimalen Luftfeuchtigkeit bzw. der optimalen Auftropffrequenz durch die Mikrodosiervorrichtung kann über ein Regelement automatisch geregelt werden, daß entsprechende Änderungen der Feuchtigkeit des Luftstroms und/oder der Auftropffrequenz vornimmt, wenn sich das gemessene Volumen des Kristalls ändert.

In der Fig. 3 ist ein solches Regelement 100 in Form eines Mikroprozessors (μP) mit einem (nicht dargestellten) Speicher dargestellt, in dem Befehle gespeichert sind, die den Mikroprozessor dazu bringen können, das erfindungsgemäße Regelungsverfahren durchzuführen.

Gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dabei zunächst mithilfe des Videosystems ein Startbild eines Proteinkristalls mit Flüssigkeitsumgebung vor dem Beginn des Kristallbehandlungsprozesses aufgenommen. Es wird dabei der Kristall zu Beginn des Verfahrens mit einem dünnen Film von Flüssigkeit umgeben, der vorzugsweise so dünn wie möglich ist. Es wird dann ein Bildsignal, welches dieses Startbild repräsentiert, über eine Verbindung zwischen Videosystem 200 und Regelement 100 vom Videosystem 200 zum Regelement 100 übertragen. Dabei kann die Übertragung des Bildsignals z.B. durch ein vom Regelement 100 zum Videosystem 200 (über eine in der Fig. 3 nicht dargestellte Verbindung) gesendetes Startbildübertragungsauslösungssignal ausgelöst werden. Alternativ kann vor dem Startbild auch ein Bild des reinen Kristalls ohne Flüssigkeitsumgebung aufgenom-

men werden, insbesondere, wenn das Volumen der Flüssigkeitsumgebung zu Beginn und während des Kristallbetropfungsverfahrens berechnet werden soll.

Das Bildsignal wird nun im Regelement 100 ausgewertet und es wird die Fläche bestimmt,
 5 die der aufgenommene Proteinkristall mit Flüssigkeitsumgebung in dem zweidimensionalen
 aufgenommenen Bild einnimmt. Die Bestimmung kann durch eines der im Stand der Technik
 entwickelten Bildauswerteverfahren erfolgen, z.B. durch einfache Auszählung der Pixel, die
 von dem Kristall mit Flüssigkeitsumgebung in dem zweidimensionalen Bild im Vergleich zur
 Gesamtpixelzahl eingenommen werden. Daraufhin wird der bestimmte Wert für die Fläche
 10 des Proteinkristalls mit Flüssigkeitsumgebung als Sollwert in dem Speicher des Mikroprozessors
 des Regelements abgelegt.

Nun wird vom Regelement 100 zu der Mikrodosiervorrichtung 300 (z.B. über den Eingang
 des Steuergeräts der Mikrodosiervorrichtung) ein Starttropfensteuersignal gesendet, das so
 15 ausgebildet ist, daß es die Anfangsfrequenz der von dem Mikrodosiersystem auf einen Kristall
 mit Flüssigkeitsumgebung zu Beginn der Kristallbehandlung aufzubringenden Tropfen reprä-
 sentiert. Im vorliegenden Beispiel soll diese Frequenz bei 2,5 kHz liegen. Das Starttropfen-
 steuersignal kann aber auch so ausgebildet sein, daß es neben der Frequenz auch weitere
 Parameter der Tropfen repräsentiert, z.B. die Anfangsgröße und/oder Anfangsform der
 20 Tropfen.

Vom Regelement 100 wird nun erneut ein Bildübertragungsauslösungssignal zum Videosystem
 200 übertragen, das darauf hin erneut die momentanen Bilddaten von dem Kristall mit
 Flüssigkeitsumgebung zum Regelement 100 aussendet. Nun wird das Bildsignal im Rege-
 25 element empfangen, verarbeitet und aus dem Bildsignal werden die momentane Fläche des
 zweidimensionalen Bildbereichs, der die Einheit Kristall mit Flüssigkeitsumgebung repräsen-
 tiert, ermittelt. Bei der vorliegenden Ausführungsform soll der zum Anfang definierte und im
 Speicher des Regelements gespeicherte Sollwert, der der Anfangsfläche entspricht, mög-
 lichst eingehalten werden, damit ein stabiles Gleichgewicht zwischen Abdampfen von Flüs-
 30 sigkeit und Hinzugewinn von Flüssigkeit durch Betropfen des Kristalls mit Flüssigkeitsumge-
 bung erreicht wird, was den empfindlichen Proteinkristall am wenigsten belastet. Nun wird
 die erneut ermittelte Fläche mit dem vorher gespeicherten Sollwert verglichen und bei Abwei-

- chungen zwischen Fläche und Sollwert wird ein Korrekturtropfensteuersignal ermittelt und zu dem Mikrodosiersystem gesendet, wobei das Korrekturtropfensignal so ausgebildet ist, daß es eine korrigierte Frequenz (und/oder Tropfenform und/oder Tropfengröße) der von dem Mikrodosiersystem auf den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung aufzubringenden Tropfen repräsentiert, die so gewählt ist, daß die Abweichung vom Sollwert minimiert wird. Es soll angenommen werden, daß im vorliegenden Fall eine Abweichung zwischen erneut ermitteltem Flächenwert und Start Sollwert auftrat, wobei die erneut ermittelte Fläche um 5 % über der Startfläche lag. Das bedeutet, daß die Tropfenfrequenz der Mikrodosiervorrichtung zu hoch eingestellt ist, so daß der Kristall mit Flüssigkeitsumgebung ständig an Flüssigkeit zunimmt, wodurch der Proteinkristall in seiner Stabilität gefährdet ist. Daher wird im vorliegenden Fall durch den Mikroprozessor des Regelements 100 ein Korrekturtropfensteuersignal ermittelt, das z.B. einer Frequenz von 1,8 kHz entspricht. Dieses Korrekturtropfensteuersignal wird nun zum Steuergerät der Mikrodosiervorrichtung gesendet, das es wiederum an die Piezopipette anlegt, wodurch die Frequenz der Tropfen und damit die Größe der Einheit Kristall mit Flüssigkeitsumgebung abnimmt. Sollte sich nun bei Wiederholung des beschriebenen Verfahrens herausstellen, daß die erneut aufgenommenen und an das Regelement übertragenen Bilddaten eine Abweichung vom Flächensollwert nach unten anzeigen, so würde über ein erneut ermitteltes und vom Regelement an die Mikrodosiervorrichtung gesendetes Tropfensteuersignal die Frequenz der Tropfen erneut verändert, bis ein Gleichgewicht zwischen Abdampfen von Flüssigkeit und Zugewinn durch Betropfen eingestellt ist. Das Verfahren wird solange wiederholt, bis der Kristallbehandlungsprozeß erfolgreich abgeschlossen ist. Anstelle oder zusammen mit der Frequenz der Tropfen können auch die Größe und/oder Form über modifizierte Tropfensteuersignale eingestellt werden.
- Fig. 4 a zeigt eine graphische Darstellung des durch das erfindungsgemäße Verfahren gemessenen Verlaufs der Änderung der Fläche des Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung in dem von dem Bildaufnahmesystem aufgenommenen Bild, wobei die Änderung in Prozent angegeben ist. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform können die in regelmäßigen Zeitabständen bestimmten Flächenwerte abgespeichert und dann zu einem Monitor gesendet werden, auf dem sie dann für einen Bediener angezeigt werden. In der Fig. 4a) wurde zu den Zeitpunkten T1, T2, T3, ..., T12 jeweils ein Mikrotropfen von dem durch das Regelement angesteuerten Mikrodosiersystem auf den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung aufgetropft. Nach jedem Trop-

fen steigt die über das Videosystem in Verbindung mit dem Regelement ermittelte Flächenänderung dA kurz an, wobei dA danach durch Wasserverdampfung abfällt, bis ein neuer Tropfen durch das Mikrodosiersystem auf den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung aufgebracht wird. Es ist in der Fig. 4a) darüber hinaus zu erkennen, daß bis zum Zeitpunkt t_1 die Flächenänderung ständig zunimmt. Um dem entgegenzuwirken, wird zum Zeitpunkt t_1 durch das Regelement ein Signal zum Mikrodosiersystem gesendet, was eine geringere Auftropffrequenz repräsentiert. Dadurch werden weniger Tropfen pro Zeiteinheit aufgetropft, wodurch die Flächenänderung dA nach dem Zeitpunkt t_1 allmählich wieder abnimmt. In der Fig. 4b) sind weitere Graphen dargestellt, die auf dem Monitor angezeigt werden können. Dabei bezeichnet dx die prozentuale Änderung der Ausdehnung des Bildes "Kristall mit Flüssigkeitsumgebung" in x-Richtung in dem gesamten aufgenommenen Bild. Dy bezeichnet entsprechend die prozentuale Änderung des zweidimensionalen Bildes des Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung in y-Richtung. Beide Werte können aus dem vom Videosystem empfangenen Bild im Regelement z.B. durch Pixelanalyse ermittelt werden. Die Werte zeigen an, ob sich die Einheit "Kristall mit Flüssigkeitsumgebung" in der einen oder anderen Richtung stärker ausgedehnt hat.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auch über die Steuerung der Zusammensetzung der Gasumgebung des Proteinkristalls versucht werden, ein Gleichgewicht zwischen Abdampfen von Flüssigkeit und Flüssigkeitszugewinn der Einheit Kristall mit Flüssigkeitsumgebung zu erzielen. Hierzu kann bei Abweichungen zwischen dem Flächensollwert und dem über das Bildsignal gemessenen momentanen Flächenwert ein Gaszusammensetzungssteuersignal über das Regelement 100 zum Gasumgebungserzeugungsmittel 400 gesendet werden, mit dem z.B. dann, wenn es sich bei dem Gas um Luft mit einem bestimmten Feuchtigkeitsgehalt handelt, dieser verändert werden kann, bis ein Gleichgewicht zwischen Abdampfen von der Einheit „Kristall mit Flüssigkeitsumgebung“ und Flüssigkeitszugewinn der Einheit „Kristall mit Flüssigkeitsumgebung“ erreicht ist. Wie sich die Einstellung der Luftfeuchtigkeit erreichen läßt, ist im Stand der Technik bekannt und z.B. in der oben bereits erwähnten Deutschen Patentanmeldung Nr. 10232172.8-52 mit dem Titel „Vorrichtung und Verfahren zur Erzeugung einer definierten Umgebung für partikelförmige Proben“ beschrieben, gemäß der sich eine hochgenaue und langzeitstabile Feuchteinstellung eines durch die oben beschriebene Halterung geführten feuchten Gasstroms am Ort des par-

5 tikelförmigen Kristalls erreichen läßt. Je höher der Feuchtigkeitsgehalt in der Luft eingestellt wird, umso mehr Wasser aus der Gasumgebung nimmt der Kristall mit Flüssigkeitsumgebung auf, so daß z.B. durch Einstellung eines höheren Feuchtigkeitsgehalts im Gasstrom einer zu starken Verdampfung von Wasser aus der Einheit "Kristall mit Flüssigkeitsumgebung" entgegengewirkt werden kann.

10 Gemäß einer weiteren alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens können auch gleichzeitig sowohl die Tropfenzugabe als auch der den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung umgebende Gasstrom in seiner Zusammensetzung geregelt werden. Hierzu muß das Regelement bei Abweichungen zwischen Sollflächenwert und Istflächenwert eine ideale Kombination aus Tropfenzugabe (d.h. Tropfenfrequenz, Tropfengröße, Tropfenform) und Gasumgebungszusammensetzung ermitteln und entsprechende Tropfensteuerkorrektursignale bzw. Gaszusammensetzungssteuersignale an die Mikrodosiervorrichtung bzw. das
15 Gasumgebungserzeugungsmittel senden.

20 Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann anstelle der Fläche des Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung in einem aufgenommenen Bild auch das Volumen des Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung bestimmt werden. Hierzu sind allerdings mehrere Videosysteme erforderlich, mit denen der Kristall mit Flüssigkeitsumgebung aus verschiedenen Lagen aufgenommen werden kann. Die aus verschiedenen Lagen zum gleichen Zeitpunkt aufgenommenen Bilder können dann im Regelement ausgewertet werden, um aus den Bildern die Volumeninformation zu gewinnen. Zur Auswertung können dabei z.B. photogrammetrische oder andere im Stand der Technik bekannte Verfahren verwendet werden,
25 die eine Bestimmung des Volumens eines Körpers aus zweidimensionalen Aufnahmen des Körpers erlauben, die aus verschiedenen Lagen angefertigt wurden und zum Teil identische Körperpunkte enthalten

30 Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann die Piezopipette auch mit einem speziellen Flüssigkeitszufuhrsystem versehen sein, mit dem es möglich ist, die Zufuhr verschiedener Flüssigkeiten in die Piezopipette zeitlich in gewünschter Weise zu steuern. In der Fig. 5 ist ein solches Flüssigkeitszufuhrsystem dargestellt. Das in der Fig. 5 dargestellte Flüssigkeitszufuhrsystem

tem umfaßt eine Präzisionsspritze 40 (elektrisch ansteuerbar), die aus einem Zylinder 41 besteht, in dem ein über einen (in der Fig. 3 nicht dargestellten) Motor angetriebener Kolben 42 hin- und herlaufen kann. Wenn der Kolben nach unten läuft, können verschiedene Flüssigkeiten aus den Flüssigkeitsbehältern 43, 44, 45 oder 46 in den Zylinder gesaugt werden, wenn
 5 eines der entsprechenden elektrisch ansteuerbaren Ventile 47, 48, 49 bzw. 50 geöffnet wird und zusätzlich das vor dem Zylinder liegende elektrisch steuerbare Ventil 51 geöffnet wird. Wird das Ventil 51 dann wieder geschlossen, das am Auslaß des Zylinders liegende elektrisch steuerbare Ventil 52 geöffnet und der Kolben 42 nach oben getrieben, so kann die angesaugte Flüssigkeit über die zur Piezopipette führende Flüssigkeitszufuhrleitung 53 zur Piezopipette
 10 geführt werden, um dann schließlich in Tropfenform auf den Kristall gegeben werden zu können.

Die Behälter 45 und 46 können z.B. zwei verschiedene Lösungen mit verschiedenen Liganden enthalten, die mit dem Protein des zu betrefenden Kristall einen Komplex bilden sollen. Die
 15 Behandlung des Kristalls kann dabei z.B. so erfolgen, daß zunächst die Lösung 1 aus dem Behälter 45 und danach die Lösung 2 aus dem Behälter 46 auf den Kristall aufgetropft wird. Zwischen den beiden Lösungen kann eine Reinigungslösung durch die Leitungen gespült werden, die sich in dem Behälter 44 befindet. Der weitere Behälter 43 dient als Abfallbehälter, um Flüssigkeitsmengen aufzunehmen, die nicht mehr benötigt werden und aus dem Zufuhr-
 20 system entfernt werden müssen. Durch geeignete zeitliche Ansteuerung der Ventile 47 – 52 und des Kolbens 42 können nun der Piezopipette die gewünschten Lösungen in der gewünschten Menge zugeführt werden.

Die zeitliche Ansteuerung der Ventile kann gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des
 25 erfindungsgemäßen Verfahrens ebenfalls durch den Mikroprozessor (μP) des in der Fig. 3 mit 100 gekennzeichneten Regelements erfolgen. Dabei wird zunächst im Speicher des μP eine gewünschte zeitliche Abfolge der Öffnungs- und Schließmomente der elektrisch ansteuerbaren Ventile abgelegt. Während des Kristallbehandlungsprozesses werden dann an den gespeicherten Zeiten elektrische Signale oder Funksignale vom Regelement zu den elektrisch an-
 30 steuerbaren Ventilen gesendet, um die Ventile in geordneter Weise zu öffnen und zu schließen. Die Flüssigkeitsbehälter können darüber hinaus auch mit elektrisch abfragbaren Füllstandsmessgeräten ausgestattet sein, die nach Aussendung eines Abfragesignals durch das

Regelement 100 ein Signal, das den aktuellen Füllstand des Behälters repräsentiert, zum Regelement 100 zurücksenden. Das Regelement kann diese Füllstandssignale auswerten und auf einem mit dem Regelement verbundenen Monitor für den Bediener zur Anzeige bringen, so daß dieser stets über die aktuellen Füllstände informiert ist. Vorzugsweise kann
 5 das Regelement auch ein Warnsignal auf dem Monitor oder in akustischer Form ausgeben, wenn während eines Kristallbehandlungsprozesses der Flüssigkeitsstand einen bestimmten vorher im Speicher des μ P abgelegten kritischen Restwert (z.B. 5%) unterschreitet, so daß der Bediener rechtzeitig ein Nachfüllen des Flüssigkeitsbehälters veranlassen kann. Anstelle der in der Fig. 5 dargestellten Ventile können auch andere Flußregler verwendet werden, die sich
 10 elektrisch ansteuern lassen, z.B. Massendurchflußregler.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können auch mehrere Mikrodosiersysteme, z.B. mehrere Piezopipetten, verwendet werden, mit denen jeweils unterschiedliche oder auch identische Substanzen (bspw. an zwei verschiedenen, lokal abgegrenzten Bereichen des Kristalls) auf den Kristall aufgebracht werden. Eine solche Anordnung kann z.B. von
 15 Vorteil sein, wenn zwei verschiedene Liganden in eine Proteinkristallstruktur eingebracht werden sollen. Die Liganden werden dann in verschiedenen Lösungen gelöst, die in die beiden Flüssigkeitsvorratsbehälter zweier Piezopipetten gegeben werden. Über die beiden Piezopipetten werden dann die beiden Lösungen mit den verschiedenen Liganden in Mikro-Tropfenform auf den Proteinkristall aufgebracht. Dabei können über das mit einer Piezopi-
 20 pette jeweils verbundene Steuergerät, das die Tropfenerzeugung steuert, unterschiedliche Spannungsimpulse und Spannungspulsfolgen an die Piezopipetten angelegt werden, um so eine optimale Form und Frequenz der Mikro-Tropfen zu erreichen, die für den jeweiligen Liganden ideal ist.

25 Die Verwendung von zwei Mikrodosiersystemen, mit denen getrennt zwei verschiedene Substanzen aufgebracht werden, die erst auf dem Kristall zusammentreffen, ist insbesondere auch dann vorteilhaft, wenn das kristallisierte Protein Katalysatorfunktion für die beiden Substanzen, die beide als Reaktanden im kristallisierten Protein gebunden werden, hat. Erfolgt das Aufspritzen der beiden Reaktanden separat durch zwei Mikrodosiersysteme während der
 30 Röntgenbestrahlung des Proteinkristalls, kann die Reaktion der Reaktanden unter katalytischem Einsatz der kristallisierten Proteine verfolgt werden. Eine Voraussetzung für eine derartige röntgenkristallographische Untersuchung ist natürlich die Stabilität des Kristalls, d.h.,

daß der Kristall seine Struktur nicht durch strukturelle Umlagerungen der kristallisierten Proteine verlieren darf, da er dadurch auch sein Diffraktionsvermögen verlieren würde.

Bei der Verwendung von mehreren Mikrodosiersystemen, die durch das Regelement angesteuert werden, muß die Regelung entsprechend angepaßt werden. Hier muß das Regelement nach Messung der aktuellen Ausdehnung des Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung über das Videosystem, Korrekturtropfensteuersignale für jedes der Mikrodosiersysteme berechnen und dann zu den jeweiligen Systemen aussenden. Hierbei muß neben einer Vorgabe in Bezug auf die aus den Bildern des Videosystems ermittelte Gesamtfläche bzw. das Gesamtvolumen des Kristalls + Flüssigkeitsumgebung auch die gewünschte Reaktionskinetik berücksichtigt werden, d.h. es können bestimmte Randbedingungen in Bezug auf das Verhältnis der aus den verschiedenen Mikrodosiersystemen pro Zeiteinheit auf zu tropfenden Flüssigkeitsmengen vorher festgelegt werden, indem sie im Speicher des μP als eine Art Flüssigkeitsverhältnisverteilungsschema abgelegt werden.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auch vor Beginn des Kristallbehandlungsprozesses ein bestimmter zeitlicher Verlauf der Zusammensetzung der den Kristall + Flüssigkeitsumgebung umgebenden Gasumgebung und ein bestimmter zeitlicher Verlauf der Frequenz (und/oder Größe und/oder Form) der von dem Mikrodosiersystem auf den Kristall + Flüssigkeitsumgebung aufzubringenden Tropfen definiert werden. In diesem Fall wird ein entsprechender Ablauf in Form einer Nachschlagetabelle, in der die einzelnen Gasumgebungssteuersignalwerte und Frequenzsteuersignalwerte den Steuerzeitpunkten zugeordnet sind, im Speicher des μP abgelegt. Während des Kristallbehandlungsprozesses werden dann zu den gespeicherten Steuerzeitpunkten die Frequenzsteuerungssignale zur Mikrodosiervorrichtung und die Gasumgebungssteuersignale zum Gasumgebungserzeugungsmittel abgegeben. In der Fig. 6 ist für eine Ausführungsform, bei der das Gas Luft mit einem bestimmten Feuchtigkeitsgehalt (H_2O) dargestellt ist, wie die relative Luftfeuchtigkeit im Laufe des Kristallbehandlungsprozesses allmählich heruntergefahren wird, und zwar von 94% auf 84%. Dabei werden zu den Zeitpunkten $t_0, t_1, t_2, \dots, t_{10}$ jeweils Gasumgebungssteuersignale vom Regelement zum Gasumgebungserzeugungsmittel gesendet, das hier aus einem Luftfeuchtigkeitseinstellmittel besteht. Während des allmählichen Reduzierens der relativen Luftfeuchtigkeit des den Kristall + Flüssigkeitsumgebung umgeben-

den Luftstroms wird gleichzeitig die Tropfenfrequenz allmählich von 1 kHz auf 6 kHz erhöht, indem zu den Zeitpunkten t_0 , t_1 , t_2 , ..., t_{10} entsprechende Frequenzsteuersignale vom Regelement 100 zum Mikrodosiersystem gesendet werden. Durch Zurückfahren der Luftfeuchtigkeit bei gleichzeitigem Erhöhen der Auftropffrequenz der Wasser enthaltenden Tropfen auf den Kristall + Flüssigkeitsumgebung wird das Volumen des Kristalls + Flüssigkeitsumgebung im wesentlichen konstant gehalten. Das führt zu einer geringen Belastung des Kristalls, was insbesondere bei empfindlichen Proteinkristallen vorteilhaft ist. Zwischen den in der Fig. 6 dargestellten Zeitpunkten t_0 , t_1 , t_2 , ..., t_{10} erfolgt die Einstellung der Luftfeuchtigkeit/Tropfenfrequenz durch das Regelement in der oben beschriebenen Weise, in dem über das Messen des Volumens der Einheit Kristall + Flüssigkeitsumgebung (oder deren Fläche im Bild) und Vergleich mit einem Volumen- (oder Flächen-)Sollwert entsprechende Korrektursignale ermittelt und ausgesendet werden (was in der Fig. 6 aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt ist). Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auch ein bestimmter gewünschter Gradient (wie er z.B. in der Fig. 6 dargestellt ist) der Luftfeuchtigkeit vor der Kristallbehandlung im Regelement einprogrammiert werden, wobei während der Kristallbehandlung mit der aufgetropften Flüssigkeit automatisch diejenige Tropfenfrequenz ermittelt wird, die geeignet ist, um das aktuelle Volumen der Einheit Kristall + Flüssigkeitsumgebung konstant zu halten. Hierzu kann das oben beschriebene Verfahren eingesetzt werden, bei dem die vom Videosystem aufgenommenen Bilder der Einheit Kristall + Flüssigkeitsumgebung vom Regelement ausgewertet und dann der ermittelte Flächen- oder Volumenwert mit einem Sollwert verglichen wird, dessen Über- oder Unterschreiten ein entsprechendes Korrekturtropfensteuersignal auslöst, mit dem die Frequenz (und/oder Form, Größe) der von dem Mikrodosiersystem abgegebenen Tropfen entsprechend verändert wird, so daß das Volumen des Kristalls + Flüssigkeitsumgebung in etwa konstant bleibt.

Ein wesentlicher Vorteil der soeben beschriebenen Ausführungsformen, bei denen mit einem Luftfeuchtigkeitsgradienten gearbeitet wird, besteht darin, daß dadurch die Durchführungsgeschwindigkeiten für die Kristallbehandlungsprozesse wesentlich erhöht werden können, da mit höheren Auftropffrequenzen gearbeitet werden kann. Dieses ist besonders bei solchen Inhibitoren und anderen Proteinkristallen einzubringenden Substanzen von Vorteil, die nur eine geringe Wasserlöslichkeit aufweisen, da eine sehr große Tropfenanzahl auf den Protein-

kristall aufgebracht werden muß, um den Prozeß der Kristallbehandlung erfolgreich abschließen zu können.

Anstelle von Wasser können natürlich für die Betropfungsflüssigkeit auch andere Lösungsmittel verwendet werden, in denen Inhibitoren oder andere in die Kristallstruktur einzubringende Stoffe gelöst sein können. So können z.B. DMSO, Ethanol, Isopropanol oder DMF (Dimethylformamid) verwendet werden. Viele Inhibitoren haben in diesen Lösungsmitteln eine bessere Löslichkeit als in Wasser, wodurch das Kristallbehandlungsverfahren beschleunigt werden kann, da weniger Tropfen auf den Kristall aufgebracht werden müssen. Auch dem Gasstrom, der um den Kristall während der Betropfung herum geführt wird, kann ein Lösungsmittel beigemischt werden, das sich von Wasser unterscheidet. Bei der Verwendung anderer Lösungsmittel ist auch die Tropfengröße zu beachten, die in der Regel über der Tropfengröße von Wasser liegen wird. So hat zum Beispiel DMSO eine Tropfengröße, die um einen Faktor 4-5 über der von Wasser liegt. Die Tropfengröße darf aber nicht zu groß sein, da sie – wie oben erwähnt – in einem bestimmten Verhältnis zur Größe des Kristalls stehen muß. Darüber hinaus können auch Gemische verschiedener Lösungsmittel verwendet werden.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auch ein Stroboskop mit Blitzlampe vorgesehen sein, um die Beobachtung der Tropfen während des Kristallbehandlungsprozesses zu ermöglichen. Dabei kann das Stroboskop mit dem Steuergerät, das die Tropfenbildung auslöst, verbunden sein und gleichzeitig mit dem Signal, das die Abgabe eines Tropfens auslöst, angesteuert werden, so daß Tropfenabgabe und Blitzlicht synchronisiert sind.

Darüber hinaus kann bei einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens eine Vorrichtung zur Drehung des Kristalls vorgesehen sein. Wenn der Kristall während der Tropfenaufbringung gedreht wird, kann der Kristallbehandlungsprozeß schneller abgeschlossen werden, da eine gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeit über die Oberfläche der Einheit „Kristall mit Flüssigkeitsumgebung“ erfolgt. Werden zudem während der Drehung Aufnahmen mit dem Bildaufnahmesystem gemacht, so kann aus diesen Aufnahmen mithilfe bekannter Bildauswerteverfahren das Volumen des Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung errechnet werden.

Da sowohl der Kristall als auch dessen Flüssigkeitsumgebung in der Regel nahezu transparent sind und das Bildaufnahmesystem lediglich die Begrenzungen der (in der Regel vor weißem Hintergrund aufgenommenen) Einheit „Kristall mit Flüssigkeitsumgebung“ erkennen kann, kann vor der Bildauswertung zum Zwecke der Flächen- oder Volumenbestimmung eine automatische Pixelauffüllfunktion vorgesehen sein, gemäß der die Pixel im Bild mit schwarzen Pixeln aufgefüllt werden, die innerhalb der durch schwarze Pixel erkennbaren Begrenzungen der Einheit „Kristall mit Flüssigkeitsumgebung“ liegen. Auch können bestimmte andere weiße Pixel-Bereiche innerhalb des Kristalls oder der Flüssigkeitsumgebung, die sich durch Lichtspiegelungen oder anderen unerwünschte optische Effekte ergeben, automatisch mit schwarzen Pixeln aufgefüllt werden, um eine korrekte Flächen- oder Volumenbestimmung zu ermöglichen. Bei der Flächen- oder Volumenbestimmung wird nach Durchführung der oben beschriebenen Korrektur dann einfach das Verhältnis zwischen schwarzen und weißen Pixeln ausgewertet.

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Steuerung der Behandlung eines Kristalls mit einer Flüssigkeit mit den folgenden Schritten:
1. es wird von mindestens einem Bildaufnahmesystem ein Bildsignal empfangen, das ein
momentanes Bild eines Kristalls mit Flüssigkeitsumgebung repräsentiert, wobei auf
den Kristall während des Kristallbehandlungsprozesses Tropfen von einem elektrisch
10 steuerbaren Mikrodosiersystem aufgebracht werden, die eine Flüssigkeit enthalten, mit
der der Kristall behandelt werden soll;
 2. es wird das Bildsignal verarbeitet und aus dem Bildsignal werden die momentane Fläche
des zweidimensionalen Bildbereichs, der die Einheit Kristall mit Flüssigkeitsum-
gebung repräsentiert, oder das momentane Volumen der Einheit Kristall mit Flüssig-
15 keitsumgebung ermittelt;
 3. es wird die momentane Fläche oder das momentane Volumen mit einem Sollwert
verglichen;
 4. bei Abweichung der Fläche oder des Volumens vom Sollwert wird ein Korrekturtrop-
fensteuersignal ermittelt und zu dem Mikrodosiersystem gesendet, wobei das Korrekt-
20 turtropfensignal so ausgebildet ist, daß es eine korrigierte Frequenz und/oder Größe
und/oder Form der von dem Mikrodosiersystem auf den Kristall mit Flüssigkeitsum-
gebung aufzubringenden Tropfen repräsentiert, die so gewählt ist bzw. sind, daß die
Abweichung vom Sollwert minimiert wird.
- 25 2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem darüber hinaus der folgende Schritt durchgeführt
wird:
5. bei Abweichung der Fläche oder des Volumens vom Sollwert wird ein Gaszusam-
mensetzungskorrektursignal zu einem elektrisch steuerbaren Gasumgebungserzeugungs-
mittel gesendet, das dazu dient, um den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung herum eine
30 Gasumgebung definierter Zusammensetzung zu erzeugen, wobei das Gaszusammenset-
zungskorrektursignal eine veränderte Zusammensetzung der Gasumgebung repräsentiert.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, bei dem die Schritte wiederholt durchgeführt werden, bis der Kristallbehandlungsprozeß abgeschlossen ist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem vor dem Schritt 1 des Verfahrens zu dem Mikrodosiersystem ein Starttropfensteuersignal gesendet wird, das so ausgebildet ist, daß es die Anfangsfrequenz und/oder Anfangsgröße und/oder Anfangsform der von dem Mikrodosiersystem auf einen Kristall mit Flüssigkeitsumgebung zu Beginn der Kristallbehandlung aufzubringenden Tropfen repräsentiert.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem vor dem Beginn der Kristallbehandlung mit der durch das Mikrodosiersystem aufzutropfenden Flüssigkeit mittels des Bildaufnahmesystems ein Startbild des Kristalls mit Flüssigkeit aufgenommen wird und ein Signal empfangen wird, das das Startbild repräsentiert.
6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem aus dem Startbild die momentane Fläche des zweidimensionalen Bildbereichs, der die Einheit Kristall mit Flüssigkeitsumgebung repräsentiert, oder das momentane Volumen der Einheit Kristall mit Flüssigkeitsumgebung ermittelt wird und der ermittelte Wert später als Sollwert verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Gasumgebungserzeugungsmittel aus einem Mittel besteht, das so ausgebildet ist, daß es einen Luftstrom mit definierter Luftfeuchtigkeit um den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung herum erzeugen kann.
8. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem durch das Gaszusammensetzungskorrektursignal die Luftfeuchtigkeit des Luftstroms, der den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung umgibt, verändert wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Korrekturtropfensteuersignal so ausgebildet ist, daß es die Frequenz und/oder die Tropfengröße und/oder die Tropfenform repräsentiert, mit der die Tropfen auf den Kristall aufgetropft werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, bei dem vor dem Kristallbehandlungsprozeß ein Signal empfangen wird, das einen bestimmten zeitlichen Verlauf der Zusammensetzung der Gasumgebung und einen bestimmten zeitlichen Verlauf der Frequenz und/oder Größe und/oder Form der von dem Mikrodosiersystem auf den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung aufzubringenden Tropfen repräsentiert.
11. Verfahren nach Anspruch 8 und 10, bei dem vor dem Kristallbehandlungsprozeß ein Signal empfangen wird, das eine während des Kristallbehandlungsprozesses allmählich zunehmende Tropfenfrequenz und eine allmählich abnehmende Luftfeuchtigkeit des den Kristall umgebenden Luftstroms repräsentiert.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-9, bei dem ein bestimmter zeitlicher Verlauf der Gaszusammensetzung vorgegeben wird und der dazu passende zeitliche Verlauf der Frequenz und/oder der Größe und/oder Form der von dem Mikrodosiersystem auf den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung aufzubringenden Tropfen automatisch ermittelt wird.
13. Für einen Computer lesbares Medium, auf dem Befehle gespeichert sind, die so ausgebildet sind, daß sie einen Prozessor dazu bringen können, ein Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche auszuführen.
14. Für ein Computer lesbares Medium nach Anspruch 13, das aus einer CD-ROM besteht.
15. Für ein Computer lesbares Medium nach Anspruch 13, das aus einer DVD besteht.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, bei der das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es Mikro-Tropfen der auf den Kristall aufzubringenden Flüssigkeit erzeugen kann, die ein Volumen aufweisen, das kleiner als das Volumen des Kristalls ist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, bei der das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es Mikro-Tropfen erzeugen kann, deren Volumen zwischen 10 und 20 Prozent des Kristallvolumens und vorzugsweise zwischen 5 und 10 Prozent des Kristallvolumens beträgt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 oder 17, bei der das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es Mikro-Tropfen erzeugen kann, deren Volumen zwischen 1 nl und 100 pl, vorzugsweise zwischen 100 pl und 20 pl und noch bevorzugt zwischen 20 pl und 4 pl liegt.

5

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder 16 bis 18, bei der das Mikrodosiersystem darüber hinaus ein Flüssigkeitszufuhrsystem aufweist, mit dem verschiedene Flüssigkeiten, die auf den Kristall aufgetropft werden sollen, in zeitlich gesteuerter Weise einem Tropfenerzeugungsteil des Mikrodosiersystems zugeführt werden können.

10

20. Verfahren nach Anspruch 19, bei der das Flüssigkeitszufuhrsystem des Mikrodosiersystems eine elektrisch ansteuerbare Präzisionsspritze und ein Leitungssystem umfaßt, mit dem die Präzisionsspritze über elektrisch steuerbare Ventile mit verschiedenen Flüssigkeitsvorratsbehältern und mit dem Tropfenerzeugungsteil des Mikrodosiersystems verbunden werden kann, um dieser Flüssigkeit für die Tropfenerzeugung zuzuführen.

15

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder 16 bis 20, bei der das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es eine Piezopipette umfaßt, die das Tropfenerzeugungsteil bildet.

20

22. Verfahren nach Anspruch 21, bei der die Piezopipette aus einer Kapillare besteht, die von einem piezoelektrischen Element umschlossen ist.

23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, bei der das Mikrodosiersystem darüber hinaus ein mit der Piezopipette elektrisch verbundenes Steuergerät umfaßt, das so ausgebildet ist, daß damit unterschiedlich geformte Spannungspulse an die Piezopipette angelegt werden können, deren Formen die Form und Größe der Mikro-Tropfen und deren Frequenz die Frequenz der Mikro-Tropfen steuern.

25

30 24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder 16 bis 20, bei der das Mikrodosiersystem eine Kapillare und ein in der Kapillare angeordnetes Mikroventil umfaßt.

25. Verfahren nach Anspruch 24, bei der das Mikrodosiersystem darüber hinaus ein Steuergerät zum Ein- und Ausschalten des Mikroventils umfaßt, um die Mikro-Tropfen zu erzeugen.

5 26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder 16 bis 25, bei dem mehrere Mikrodosiersysteme vorgesehen sind, die im Verhältnis zur Halterung so angeordnet sind, daß damit Mikro-Tropfen verschiedener Flüssigkeiten auf den Kristall mit Flüssigkeitsumgebung aufgebracht werden können.

10 27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder 16 bis 25, bei der die Flüssigkeit aus einer Lösung besteht.

28. Verfahren nach Anspruch 27, bei der in der Lösung eine Substanz oder mehrere Substanzen gelöst ist bzw. sind, die in die Struktur des Kristalls eingebracht werden soll bzw. sollen oder mit dieser reagieren soll bzw. sollen.

15

29. Verfahren nach Anspruch 28, bei der die Substanz bzw. die Substanzen aus einem oder mehreren Liganden oder Inhibitoren besteht bzw. bestehen.

20 30. Verfahren nach Anspruch 28, bei der die Substanz bzw. die Substanzen einen oder mehrere Reaktanden enthält bzw. enthalten, der bzw. die mit dem oder im Proteinkristall reagieren soll bzw. sollen.

31. Verfahren nach Anspruch 27, bei der die Lösung aus Wasser besteht, in dem eine Substanz gelöst ist, die mit einem Proteinkristall wechselwirken soll.

25

32. Verfahren nach Anspruch 31, bei der die Substanz aus einem Inhibitor oder Liganden besteht, der in Wasser nur schwer löslich ist.

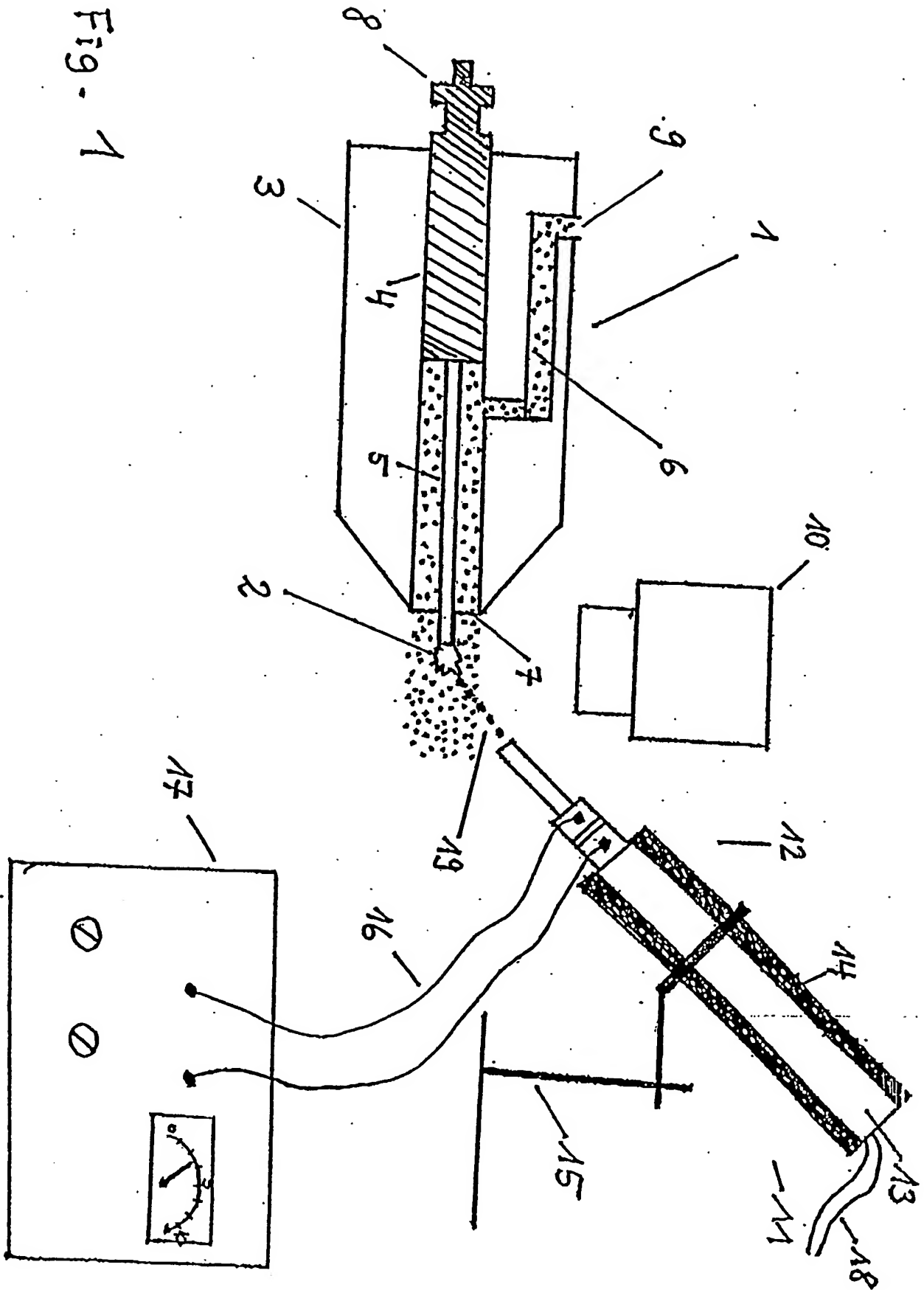


Fig. 1

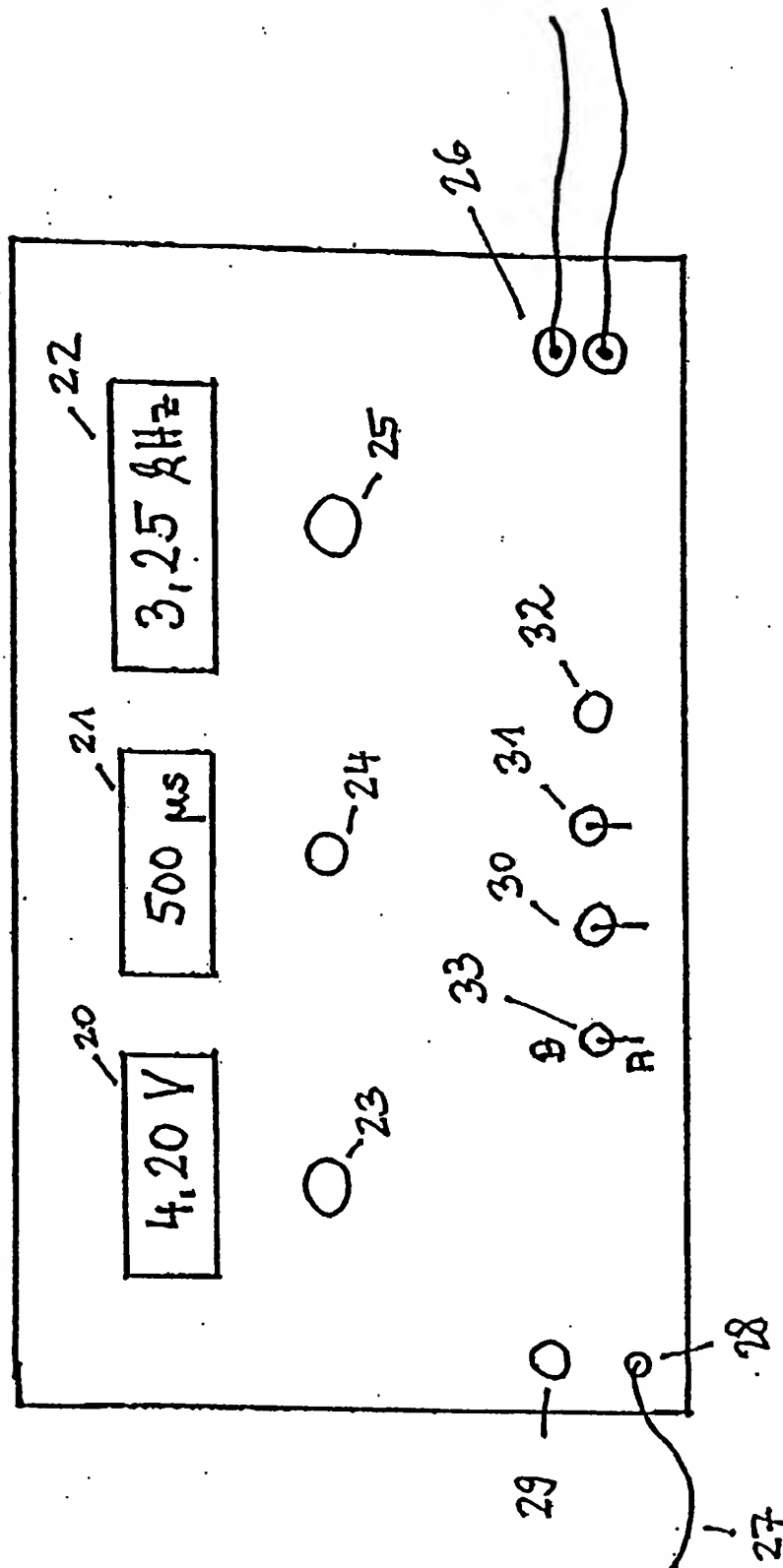


Fig. 2

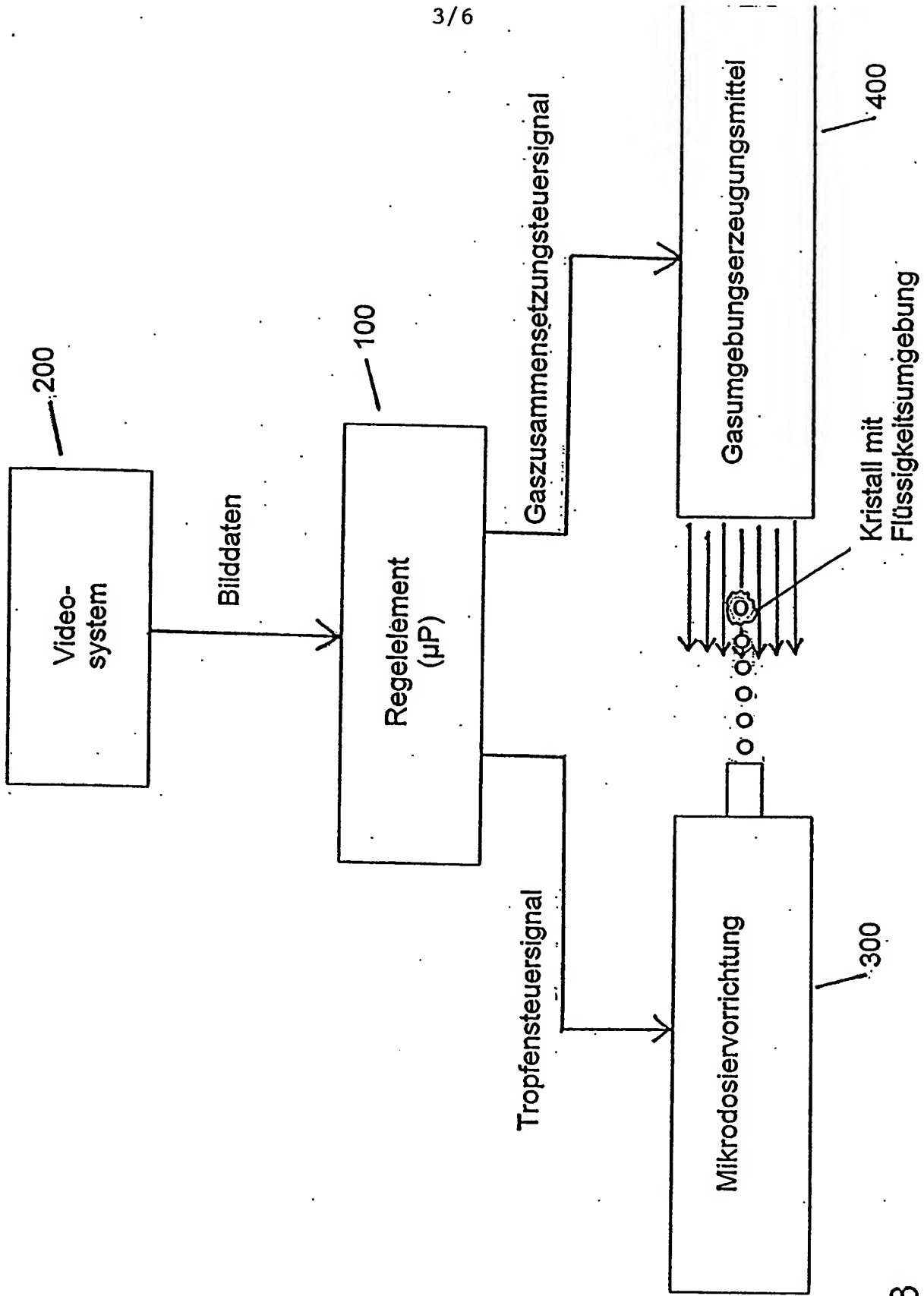
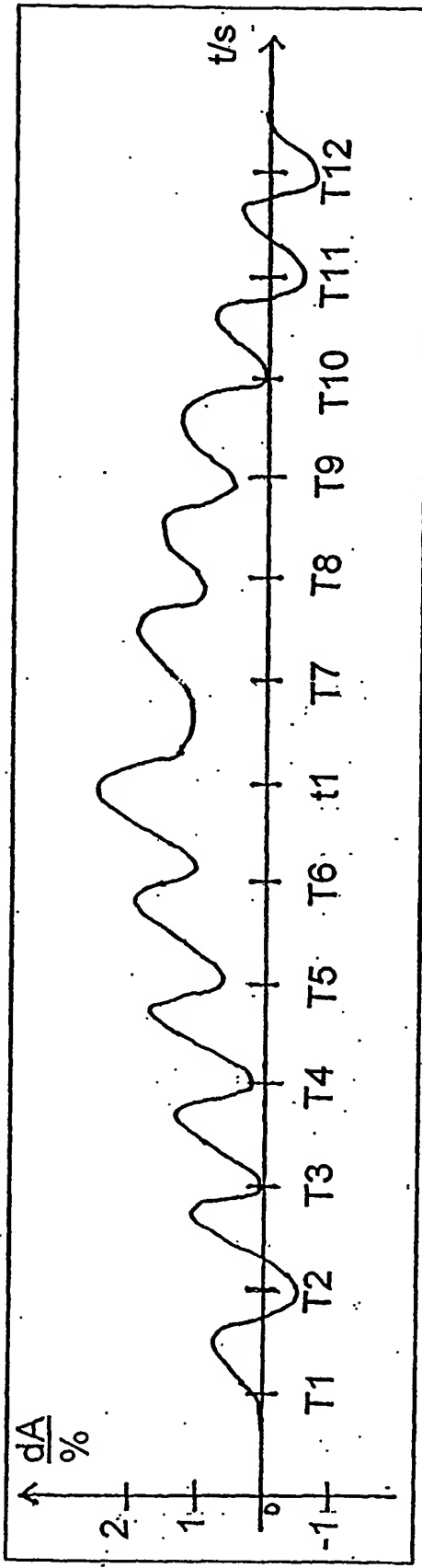


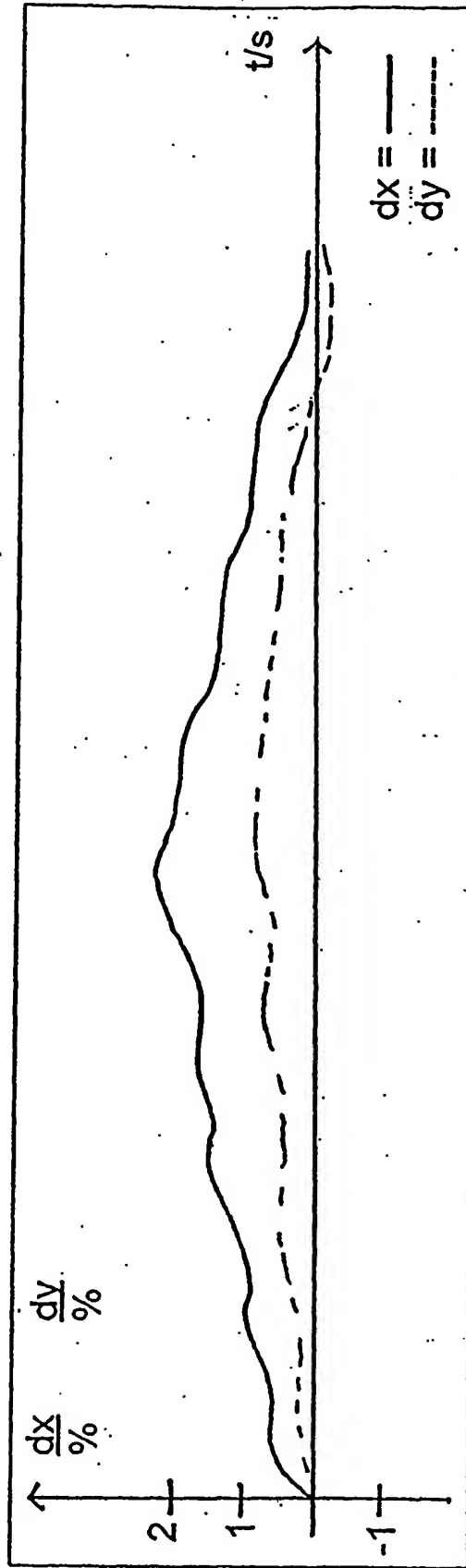
Fig. 3

Fig. 4

a)



b)



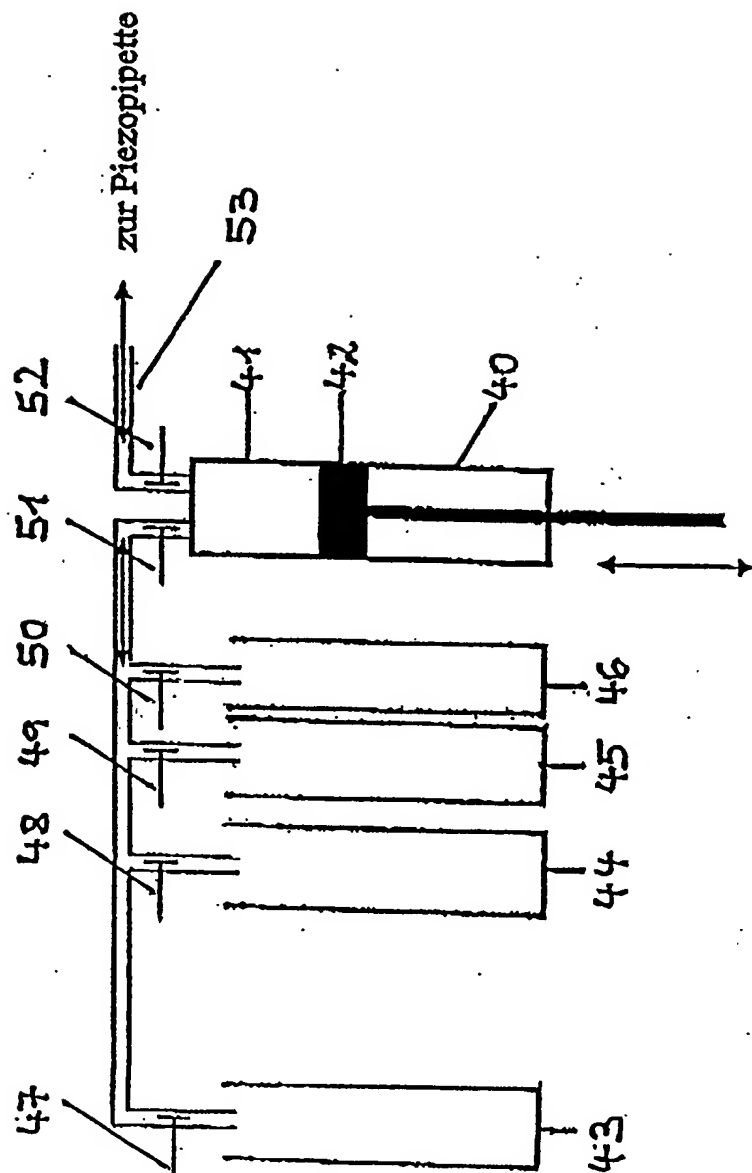
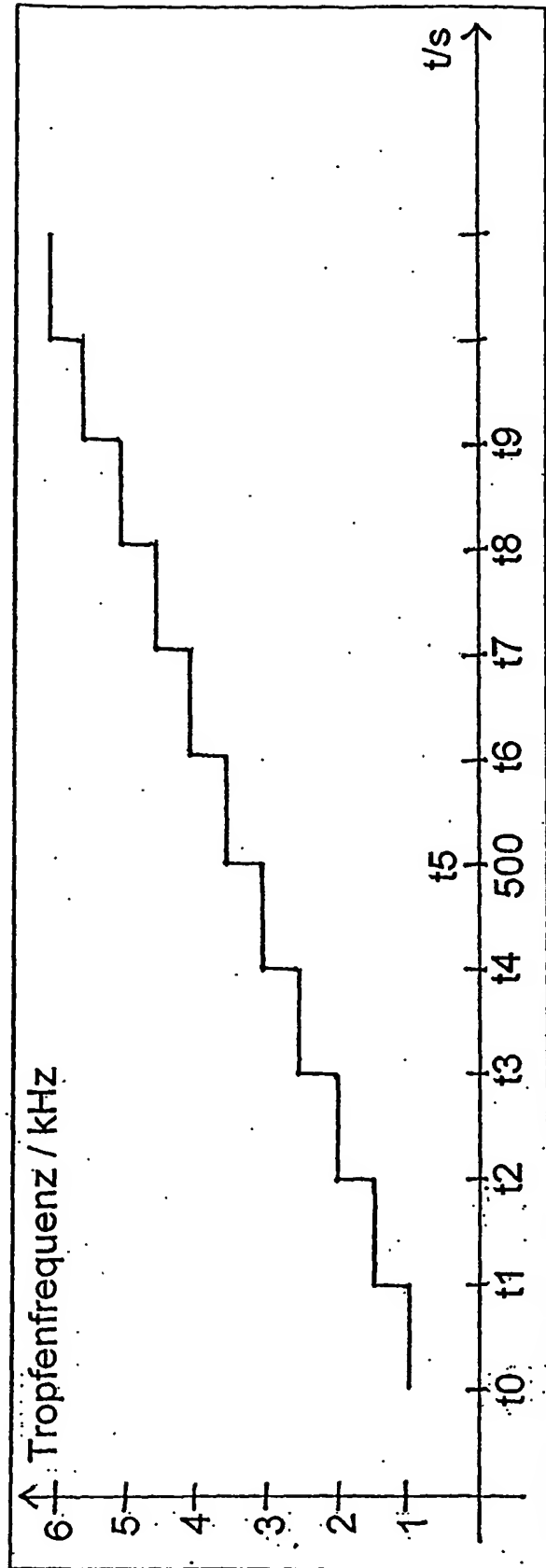
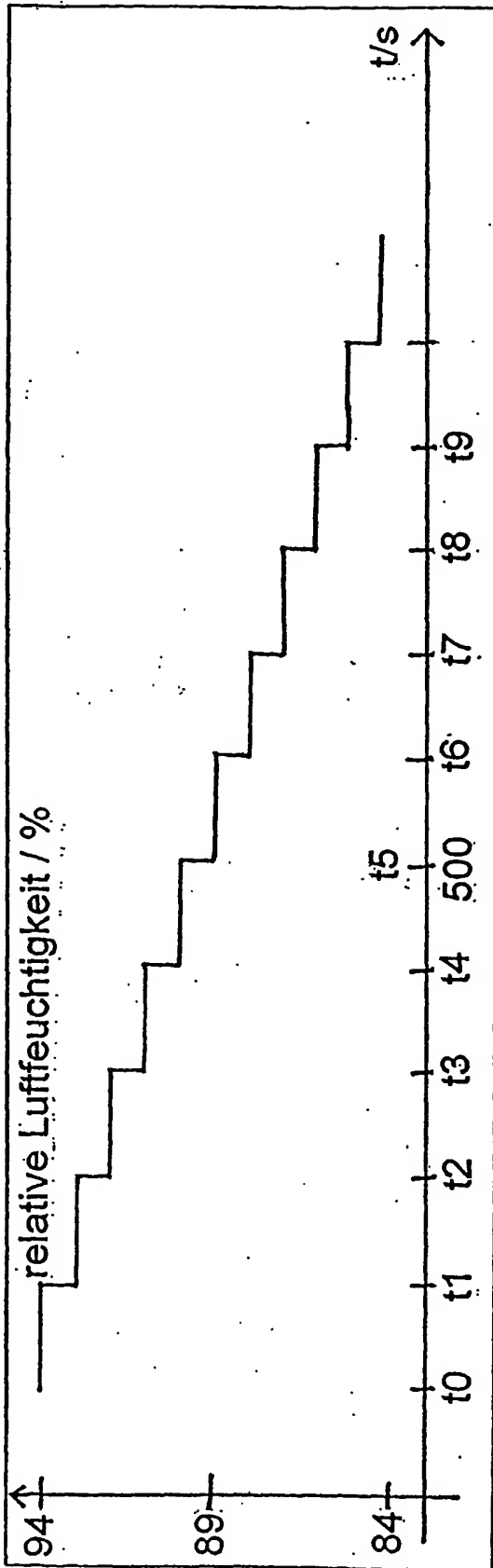


Fig. 6



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/483 C30B31/04 C30B29/58		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C30B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SANTESSON S ET AL: "Screening of nucleation conditions using levitated drops for protein crystallization" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 75, no. 7, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 1733-1740, XP001170672 ISSN: 0003-2700 the whole document <div style="text-align: center;">----- -/--</div>	1,3-6,9, 13-23, 26-32
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div> </div>		
* Special categories of cited documents :		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>* & * document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">1 February 2005</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">09/02/2005</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Johnson, K</div>

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/057520 A1 (CHEMICAL HOLOVOICE) 25 July 2002 (2002-07-25)	1,3-6,9, 13-23, 26-32
Y	page 15, line 30 - page 18, line 14 page 19, line 23 - page 20, line 7 page 23, line 19 - page 25, line 16 figures 4,5B,9,10	2,7,8, 10-12, 24,25
Y	----- WO 03/050598 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 19 June 2003 (2003-06-19)	2,7,8, 10-12
A	paragraph '0048! - paragraph '0049! paragraph '0074! - paragraph '0104! figures 1,9A-9G	1
A	----- DE 198 42 797 C1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V) 27 January 2000 (2000-01-27) cited in the application column 3, line 64 - column 8, line 2 figures	1,2,7,8, 10-12
Y	----- GB 2 249 492 A (THE * IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE, TECHNOLOGY & MEDICINE; * DOUGLAS INS) 13 May 1992 (1992-05-13)	24,25
A	page 7, paragraph 4 - page 9, paragraph 1 figure 1	1,19-21, 27
A	----- WO 99/45379 A2 (ABBOTT LABORATORIES) 10 September 1999 (1999-09-10) page 9, line 10 - page 13, line 7 figure 3	1,27-32

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 02057520	A1	25-07-2002	CA	2434886 A1		25-07-2002
			EP	1360349 A1		12-11-2003
			JP	2004532974 T		28-10-2004
			US	2003049642 A1		13-03-2003
WO 03050598	A2	19-06-2003	AU	2002361704 A1		23-06-2003
			EP	1463971 A2		06-10-2004
			US	2003152194 A1		14-08-2003
DE 19842797	C1	27-01-2000	AT	219834 T		15-07-2002
			DE	59901839 D1		01-08-2002
			EP	0987543 A2		22-03-2000
			US	6355217 B1		12-03-2002
GB 2249492	A	13-05-1992	NONE			
WO 9945379	A2	10-09-1999	AU	2887099 A		20-09-1999
			AU	767991 B2		27-11-2003
			AU	2987899 A		20-09-1999
			BG	104802 A		30-04-2001
			BR	9908563 A		21-11-2000
			CA	2321968 A1		10-09-1999
			CN	1299467 T		13-06-2001
			EP	1068531 A2		17-01-2001
			HU	0101959 A2		28-09-2001
			JP	2002506206 T		26-02-2002
			NO	20004433 A		06-11-2000
			PL	343264 A1		30-07-2001
			SK	13242000 A3		12-03-2001
			TR	200002572 T2		21-11-2000
			TR	200101127 T2		21-06-2002
			TR	200101129 T2		21-06-2002
			TR	200101200 T2		21-02-2002
			WO	9945389 A2		10-09-1999
			US	6297021 B1		02-10-2001
			US	2004219607 A1		04-11-2004

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/483 C30B31/04 C30B29/58

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C30B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SANTESSON S ET AL: "Screening of nucleation conditions using levitated drops for protein crystallization" ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 75, Nr. 7, 1. April 2003 (2003-04-01), Seiten 1733-1740, XP001170672 ISSN: 0003-2700 das ganze Dokument ----- -/--	1,3-6,9, 13-23, 26-32

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Februar 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/02/2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Johnson, K

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/057520 A1 (CHEMICAL HOLOVOICE) 25. Juli 2002 (2002-07-25)	1,3-6,9, 13-23, 26-32
Y	Seite 15, Zeile 30 - Seite 18, Zeile 14 Seite 19, Zeile 23 - Seite 20, Zeile 7 Seite 23, Zeile 19 - Seite 25, Zeile 16 Abbildungen 4,5B,9,10	2,7,8, 10-12, 24,25
Y	WO 03/050598 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 19. Juni 2003 (2003-06-19)	2,7,8, 10-12
A	Absatz '0048! - Absatz '0049! Absatz '0074! - Absatz '0104! Abbildungen 1,9A-9G	1
A	DE 198 42 797 C1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V) 27. Januar 2000 (2000-01-27) in der Anmeldung erwähnt Spalte 3, Zeile 64 - Spalte 8, Zeile 2 Abbildungen	1,2,7,8, 10-12
Y	GB 2 249 492 A (THE * IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE, TECHNOLOGY & MEDICINE; * DOUGLAS INS) 13. Mai 1992 (1992-05-13)	24,25
A	Seite 7, Absatz 4 - Seite 9, Absatz 1 Abbildung 1	1,19-21, 27
A	WO 99/45379 A2 (ABBOTT LABORATORIES) 10. September 1999 (1999-09-10) Seite 9, Zeile 10 - Seite 13, Zeile 7 Abbildung 3	1,27-32

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02057520	A1	25-07-2002	CA 2434886 A1	25-07-2002
			EP 1360349 A1	12-11-2003
			JP 2004532974 T	28-10-2004
			US 2003049642 A1	13-03-2003
WO 03050598	A2	19-06-2003	AU 2002361704 A1	23-06-2003
			EP 1463971 A2	06-10-2004
			US 2003152194 A1	14-08-2003
DE 19842797	C1	27-01-2000	AT 219834 T	15-07-2002
			DE 59901839 D1	01-08-2002
			EP 0987543 A2	22-03-2000
			US 6355217 B1	12-03-2002
GB 2249492	A	13-05-1992	KEINE	
WO 9945379	A2	10-09-1999	AU 2887099 A	20-09-1999
			AU 767991 B2	27-11-2003
			AU 2987899 A	20-09-1999
			BG 104802 A	30-04-2001
			BR 9908563 A	21-11-2000
			CA 2321968 A1	10-09-1999
			CN 1299467 T	13-06-2001
			EP 1068531 A2	17-01-2001
			HU 0101959 A2	28-09-2001
			JP 2002506206 T	26-02-2002
			NO 20004433 A	06-11-2000
			PL 343264 A1	30-07-2001
			SK 13242000 A3	12-03-2001
			TR 200002572 T2	21-11-2000
			TR 200101127 T2	21-06-2002
			TR 200101129 T2	21-06-2002
			TR 200101200 T2	21-02-2002
			WO 9945389 A2	10-09-1999
			US 6297021 B1	02-10-2001
			US 2004219607 A1	04-11-2004